Journal of Iranian Plant Protection Research
https://jpp.um.ac.ir

CC BY

Research Article
Vol. 37, No. 2, Summer 2023, p. 105-117

Identification of Fungal Endophytes in Aerobic Rice Cultivation of Golestan Province

Z. Zare[1], S.E. Razavi[2*], K. Rahnama[3], A. Taheri[4], J. Gherekhloo[5]

Received: 20-08-2022
Revised: 25-02-2023
Accepted: 14-03-2023
Available Online: 14-03-2023

How to cite this article:
Zare, Z., Razavi, S.E., Rahnama, K., Taheri, A., & Gherekhloo, J. (2023). Identification of fungal endophytes in aerobic rice cultivation of Golestan province. *Journal of Iranian Plant Protection Research, 37*(2), 105-117. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2023.78347.1100

Introduction

Rice is one of the most important grains in the world and large part of its consumption is related to Middle East. Iran ranks 23rd in production, 26th in cultivation, and 13th in rice consumption with nearly 560,000-hectare rice lands and an annual production of nearly 2.5 million tons. In natural and agricultural ecosystems, plants are associated with large populations of microorganisms in the rhizosphere, endosphere (inside the root), leaves (phyllosphere), as well as pollen and seeds. These microorganisms spend all or part of their life cycle inside the healthy tissues of host plant without any obvious sign of disease. The stable coexistence between endophytes and plants is due to production of biological secondary metabolites with a unique structure, which positively affects the survival of plant growth in adverse conditions. Studies have shown that endophytic fungi increase resistance to drought, insects, diseases and host tolerance level, especially in stress conditions. Considering the increase in the risk of dehydration and the lack of sufficient water resources and the development and adoption of aerobic rice cultivation, it is important to identify endophytic fungi that increase tolerance to drought stress and improve the growth factors of the host plant. There are relatively few studies on endophytic fungi that colonize healthy tissues of rice plants under aerobic conditions. Therefore, the aim of this study is to evaluate endophytic fungal collections in different parts of aerobically cultivated rice plants.

Materials and Methods

In this study, in order to identify endophytic fungi in aerobic cultivation of rice in Golestan province, sampling were carried out from several aerobic rice fields in Golestan province, including Gorgan, Kordkuy, Bandar Gaz, Aliabad and Kalaleh cities during the months of May to September in 2019-2020. Plant tissues were transferred to the laboratory (Department of Plant Protection) in separate paper bags along with specifications. Purification was performed on a 2% water-agar medium using Hyphal tip method. Based on investigations and morphological data, a number of isolates were selected as representatives for molecular identification. Genomic DNA was extracted from mycelia grown in PDB (Potato Dextrose Broth) culture medium according to the CTAB method with a slight modification, and the polymerase chain reaction (PCR) was performed according to Nemati and Abdulhazadeh method. The ITS region (ITS4-5.8S-ITS5) of the selected isolates was amplified during the PCR reaction using ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers and The β-tubulin region was amplified by T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and β Sandy-R (5'-GCRCGNGGVACRTACTTGTT-3') primers. Purification and sequencing of PCR products was done by Pishgam Biotechnology Company. The sequences of

1, 2, 3 and 4- Ph.D. Student, Assistant Professor and Associate Professors Department of Plant Protection, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: razavi@gau.ac.ir)
5- Associate Professor, Department of Agriculture, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
DOI: 10.22067/jpp.2023.78347.1100

ITS and β-tubulin regions were modified and extracted using Chromas 2.6.6 software. Nucleotide sequences of the selected isolates were compared with the available sequences in the Gene bank by Blast algorithm and the sequences data were submitted in the NCBI database website. Phylogenetic trees were drawn using the Maximum likelihood method and MEGA 6.06 software.

Results and Discussion

Based on preliminary morphological studies, 20 isolates were selected as representatives of purified isolates and were identified by molecular analysis. In this study, a total of 39 fungal isolates were obtained, that the highest number of the isolates belonged to the pods of rice plants with the frequency of 17 isolates and the lowest number of isolates belonged to the roots of rice plants with 10 isolates. Among the 6 genera identified in this research, the largest number of isolates was belonged to *Alternaria* and *Fusarium* genera, with 18 and 6 isolates, respectively, and the highest number of species was belonged to *Fusarium* genus with 6 species. Fungal species include: *F. chlamydosporum, F. proliferatum, F. incarnatum, F. solani, F. fujikuroi, F. verticillioides, S. bactrocephalum, N. sphaerica, N. oryzae, A. alternata, E. nigrum, C. cladosporioides*. Among these species, *Nigrospora sphaerica, E. nigrum* and *S. bactrocephalum* are reported for the first time in this study as rice plant endophytes in Iran.

Conclusion

Investigation of endophytic fungi in the present study indicates that some of these isolates, including *F. chlamydosporum, F. proliferatum, F. fujikuroi* are pathogenic fungi. It means that range of the endophytic life and pathogenic life cannot be separated and determined and environmental conditions and nutritional status determine the type of interaction. *F. chlamydosporum* causes Fusarium root and crown rot, is reported in some sources as an endophytic fungus in various plants.

Keywords: Fusarium, Morphology, Molecular, Rice endophytic, *Sarocladium bactrocephalum*

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، ص. ۱۱۷-۱۰۵

شناسایی اندوفیت‌های قارچی در کشت هوازی برنج استان گلستان

زینب زارع[۱]- سید اسماعیل رضوی[۲*]- کامران رهنما[۳]- عبدالحسین طاهری[۴]- جاوید قرخلو[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

چکیده

برنج از مهم‌ترین غلات مورد مصرف غذایی مردم جهان به‌ویژه خاورمیانه می‌باشد. ایران با داشتن نزدیک به ۵۶۰ هزار هکتار زمین کشاورزی اختصاص یافته برای کشت برنج و تولید سالانه نزدیک به ۲/۵ میلیون تن، رتبه جهانی ۲۳ در تولید و ۲۶ در زمین‌های تحت کشت و رتبه ۱۳ در مصرف آن را به خود اختصاص داده است. در این پژوهش، به‌منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت در کشت هوازی برنج استان گلستان، بازدیدهایی از مزارع مختلف برنج هوازی استان گلستان شامل شهرستان‌های گرگان، کردکوی، بندرگز، علی‌آباد و کلاله طی ماه‌های اردیبهشت تا شهریور سال ۱۳۹۸-۱۳۹۹ به‌عمل آمد. پس از خالص‌سازی، شناسایی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و توالی ناحیه ITS و TUB انجام گرفت. در این پژوهش، در مجموع ۳۹ جدایه قارچی متعلق به ۱۲ گونه از ۶ جنس به‌دست آمد که بیشترین تعداد جدایه متعلق به غلاف گیاه برنج با فراوانی ۱۶ جدایه و کمترین آن ۱۱ جدایه به ریشه گیاه برنج تعلق داشت. از بین ۶ جنس شناسایی شده در این تحقیق، بیشترین تعداد جدایه متعلق به جنس‌های *Alternaria* و *Fusarium*، به‌ترتیب هر یک با فراوانی ۱۹ و ۶ جدایه، و همچنین بیشترین تعداد گونه حاصل به جنس *Fusarium* با فراوانی شش گونه تعلق داشت. گونه‌های قارچی شامل: *Fusarium chlamydosporum*، *F. proliferatum*، *F. incarnatum*، *F. solani*، *F. fujikuroi*، *F. verticillioides*، *Sarocladium bactrocephalum*، *Nigrospora sphaerica*، *N. oryzae*، *Alternaria alternata*، *Epicoccum nigrum*، *Cladosporium cladosporioides* هستند. در این میان گونه‌های *Nigrospora sphaerica*، *Epicoccum nigrum* و *Sarocladium bactrocephalum* برای اولین‌بار در این مطالعه به‌عنوان اندوفیت گیاه برنج در ایران گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت برنج، ریخت‌شناسی، فوزاریوم، مولکولی، *Sarocladium bactrocephalum*

مقدمه

در اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی، گیاهان با توده‌های بسیاری از جمعیت میکروارگانیسم‌ها در خاک اطراف ریشه، آندوسفر (درون ریشه)، برگ‌ها (فیلوسفر)، و همچنین گردها و دانه‌ها مرتبط هستند (Nair and Padmavathy, 2014؛ Liu *et al.*, 2017). این میکروارگانیسم‌ها تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود را داخل بافت های سالم گیاه میزبان و بدون علائم آشکاری از بیماری سپری می‌کنند (Faeth and Fagan, 2002). اگرچه در دوران پیری میزبان، این عوامل اندوفیت ممکن است موجب ایجاد بیماری در میزبان شوند (Rodriguez *et al.*, 2009). باید توجه نمود که اندوفیت‌ها، بافت های سالم گیاهی را کلونیزه می‌کنند و این تعامل به‌عنوان واکنش متقابل تلقی می‌شود (Liu *et al.*, 2020a). اندوفیت‌ها در بافت‌های گیاهی، مواد غذایی را از گیاه میزبان دریافت می‌کنند و در مقابل با تولید متابولیت‌هایی موجب افزایش تحمل میزبان در برابر عوامل زنده و غیر زنده می‌شوند (Rodriguez *et al.*, 2005). اندوفیت‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌هایی هستند که بافت‌های گیاه را به صورت درون سلولی یا بین سلولی به اشغال خود در آورده، بدون اینکه آسیبی به گیاه وارد شود (Arnold, 2007؛ Porras Alfaro and Bayman,

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: Email: razavi@gau.ac.ir)
۵- دانشیار گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

DOI: 10.22067/jpp.2023.78347.1100

2011). از زمان کشف اندوفیت، پژوهشگران تعاریف متعددی را برای توصیف این عوامل درون‌رست ذکر نموده‌اند. به طور کلی اندوفیت‌ها نقش‌های فیزیولوژیکی و اکولوژیکی مهمی را در زندگی میزبان خود ایفا می‌کنند (Tintjer and Rudgers, 2006). برهمکنش گیاه و اندوفیت برای کسب مواد مغذی، رشد، نمو و افزایش تحمل به تنش‌های مختلف محیطی بسیار مهم است (Schulz and Boyle, 2005). این برهمکنش ممکن است موقتی بوده و عامل اندوفیت تحت عوامل متعددی از جمله تنش به عامل بیماری‌زا تغییر پیدا کند (Schulz and Boyle, 2005). همزیستی پایدار بین اندوفیت‌ها و گیاهان به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه زیستی با ساختار منحصر به فرد است که به طور مثبت بر بقای رشد گیاه در شرایط نامطلوب تأثیر می‌گذارد (Sheteiwy *et al*., 2021b). این متابولیت‌ها شامل هورمون‌های گیاهی، پلی ساکاریدهای خارج سلولی (EPS)، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، اسیدهای فنولی، بنزوپیرانول‌ها، کینون وکوئینون‌ها، استروئیدها، تترالون‌ها، زانتون‌ها، آنزیم‌هایی مانند ۱- آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید دآمیناز (ACCD) و غیره می‌باشد (Hamilton *et al*., 2016؛ Hatamzadeh and Rahnama, 2016). این میکروارگانیسم‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه ساز و کارهایی را برای غلبه بر عوامل بیماری‌زا به کار می‌برند (Tan and Zou, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد گیاهان میزبان مواد مغذی را برای اندوفیت‌ها فراهم می‌کنند و در مقابل این اندوفیت‌ها ممکن است موجب مقاومت گیاه در برابر آفات و بیماری‌ها شوند و یا وظایف مفید دیگری داشته باشند (Arnold and Herre, 2003). اندوفیت‌ها تقریباً از همه گونه‌های گیاهی گزارش شده‌اند. تخمین زده می‌شود که حداقل یک میلیون گونه قارچ اندوفیت در ۳۰۰۰۰۰ گونه گیاهی شناخته شده در جهان وجود داشته باشد. اندوفیت‌ها تا به امروز تقریبا از همه بافت‌های گیاهی جداسازی شده‌اند (Staniek *et al*., 2008). جداسازی قارچ‌ها از گیاهان زراعی بسیار بیشتر از درختان بوده است و در بین درختان، درختان غیر مثمر بیشتر از درختان مثمر مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Hatamzadeh and Rahnama, 2016). بیشتر این مطالعات روی برگ و بررسی اندکی در زمینه بافت چوبی و بافت پوست انجام شده است (Weber, 2009).

مطالعات متعددی روی قارچ‌های اندوفیت در محصولات مختلف مانند ذرت (Fisher and Petrini, 1992)، موز (Cao *et al*., 2002)، قهوه (Santamaria and Bayman, 2005) و گندم (Larran *et al*., 2007) انجام شده است که نشان‌دهنده تنوع قارچ های اندوفیت می‌باشد. برنج یکی از مهمترین محصولات زراعی است که نقش بسیار مهمی را در جیره غذایی مردم جهان ایفا می‌کند. خشک‌سالی و کم‌آبی از عوامل تهدیدکننده حیات در مناطق وسیعی از ایران بوده و پیش‌بینی می‌شود که مشکل کم‌آبی در سال‌های آینده بحرانی‌تر خواهد شد. معرفی روش‌های جایگزین تولید برنج که نیاز به آب کم‌تری داشته باشد بسیار ضروری‌است. بنابراین تغییر شیوه کشت برنج از مرسوم به هوازی به‌دلیل مصرف میزان کمتر آب مورد توجه کشاورزان قرار گرفته است. به‌طور کلی در سال ۲۰۰۷ حدود ۲۳ درصد برنج در سطح جهان به‌صورت کاشت مستقیم بذر به شیوه کاشت بذر در بستر خشک تولید شده است (Rao *et al*., 2007). مطالعات نشان داده‌است، قارچ های اندوفیت در افزایش مقاومت به خشکی، حشرات، مقاومت به بیماری و به‌طور کلی به تحمل میزبان به ویژه در شرایط تنش کمک می‌کنند (Rodriguez *et al*., 2009). با توجه به افزایش روند خطر کم‌آبی و نبود منابع کافی آب و توسعه و پذیرش کشت برنج به‌صورت هوازی، شناسایی قارچ‌های اندوفیتی که موجب افزایش تحمل به تنش خشکی و بهبود فاکتورهای رشدی گیاه میزبان می‌شود، حائز اهمیت است. بررسی‌های نسبتا کمی بر روی قارچ‌های اندوفیتی که بافت‌های سالم گیاه برنج را در شرایط هوازی کلونیزه می‌کنند، وجود دارد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی مجموعه‌های قارچی اندوفیت در بخش‌های مختلف گیاهان برنج کشت شده به روش هوازی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

برای نمونه‌برداری، بازدیدهایی از مزارع مختلف برنج هوازی استان گلستان شامل شهرستان‌های گرگان، کردکو، بندرگز، علی‌آباد و کلاله طی ماه‌های اردیبهشت تا شهریور سال ۱۳۹۹-۱۳۹۸ به‌عمل آمد. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی و از قسمت‌های مختلف گیاهان برنج سالم و فاقد هرگونه علائم آفات و بیماری‌ها در مرحله پنجه‌زنی، ساقه‌دهی و خوشه‌دهی انجام گرفت و در مجموع ۱۰ بوته از هر مکان جمع‌آوری شد. اندام‌های گیاهی به تفکیک، درون پاکت‌های کاغذی با ثبت مشخصات به آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. جداسازی قارچ‌ها به روش گنجعلی و همکاران با اندکی تغییرات انجام گرفت (Ganjali *et al*., 2004). برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت، نمونه‌های گیاهی پس از چندبار شستشو با آب جاری، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۳۰-۳۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم نیم درصد روی یک همزن الکتریکی قرار داده شدند. در نهایت قطعات پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر سترون و خشک‌شدن روی کاغذ صافی استریل، روی محیط‌کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) همراه با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. خالص‌سازی قارچ‌های رشد یافته، با استفاده از روش نوک ریسه روی محیط کشت آب-آگار دو درصد صورت گرفت.

بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها و شناسایی گونه‌ها

قارچ‌های اندوفیت خالص شده با بررسی ساختارهای میکروسکوپی و ماکروسکوپی شناسایی شدند. برای شناسایی هر یک از این قارچ‌ها با توجه به رنگ پرگنه و اسپور تولید شده، از ۲ محلول اسیدلاکتیک برای تیره رنگ‌ها و لاکتوفنل آنیلین بلو برای رنگ روشن‌ها استفاده گردید. برای شناسایی، صفات ریخت‌شناسی مانند خصوصیات پرگنه، شکل پرگنه، رنگ سطح رویی و قسمت زیرین پرگنه، وضعیت میسلیوم هوایی، ساختارهای تولیدمثلی، خصوصیات اسپور و غیره بررسی شد و با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی از جمله راهنمای قارچی الیس، بارنت و هانتر و لزلی و سامرل شناسایی قارچ‌ها انجام شد (Ellis, 1971؛ Barnett and Hunter, 1998؛ Leslie and Summerell, 2006).

استخراج DNA، تکثیر و توالی‌یابی و شناسایی مولکولی جدایه‌ها

بر اساس بررسی‌ها و داده‌های ریخت‌شناسی تعدادی از جدایه‌ها به‌عنوان نماینده، برای مطالعات مولکولی و شناسایی مولکولی انتخاب شدند (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی از میسلیوم‌های رشد یافته در محیط‌کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) و طبق روش CTAB با اندکی تغییر انجام و مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مطابق با روش نعمتی و عبداله‌زاده انجام گرفت (Nemati and Abdollahzadeh, 2009). ناحیه ITS (ITS4-5.8S-ITS5) طی واکنش PCR و با استفاده از دو آغازگر ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al*., 1990) و ناحیه β-tubulin توسط دو آغازگر T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') و β-Sandy-R (5'-GCRCGNGGVACRTACTTGTT-3') تکثیر شدند (O'Donnell and Cigelnik, 1997). شرایط PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه که در هر یک ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی بود. در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام‌شد. خالص‌سازی و تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت زیست‌فناوری پیشگام انجام گرفت. توالی‌های نواحی ITS و β-tubulin با استفاده از نرم افزار Chromas 2.6.6 اصلاح و استخراج شدند. به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها، ابتدا با استفاده از ابزار جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI توالی‌های نواحی ITS و β-tubulin جدایه-های مورد نظر، بررسی شد. توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های این پژوهش با توالی موجود در بانک ژن مقایسه و توالی‌ها در سایت NCBI ثبت گردیدند. درختان فیلوژنتیکی با استفاده از روش Maximum likelihood و با نرم‌افزار MEGA 6.06 ترسیم شدند (Tamura *et al*., 2013).

نتایج و بحث

در این بررسی ۴۱ جدایه قارچ به‌دست آمد. بر اساس بررسی‌های مقدماتی ریخت‌شناسی، از بین جدایه‌های خالص‌شده ۲۰ جدایه به عنوان نماینده انتخاب و با استفاده از بررسی‌های مولکولی توالی ناحیه ITS4-5.8S-ITS5 و TUB شناسایی شدند. در مجموع ۱۲گونه متعلق به ۶ جنس قارچی شناسایی گردید و توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۱ و ۲). ارزیابی تشابه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) از طریق انجام جستجوی BLASTn انجام شد. درخت تک‌ژنی مبتنی بر ناحیه TUB برای جنس فوزاریوم و ناحیه ITS برای سایر جنس‌های شناسایی شده با استفاده از روش Maximum Likelihood رسم شد. برای گونه‌های فوزاریوم مورد بررسی از ۳۱ جدایه استاندارد با گونه *Colletotrichum gloeosporioides* به‌عنوان گروه خارجی (شکل ۲)، و برای سایر جنس‌های این پژوهش از ۱۳ جدایه استاندارد و گونه *Xylaria xylarioides* به‌عنوان گروه خارجی اخذ شده از بانک ژن، استفاده شد (شکل ۴). توصیف ریخت‌شناسی گونه‌هایی با فراوانی بیشتر و گونه‌های کمتر شناخته شده در ادامه آورده شده است.

Fusarium chlamydosporum **Wollenw. & Reinking 1925**

از این گونه ۶ جدایه از ریشه برنج جدا شد. میسلیوم‌ها نسبتا متراکم، سفید مایل به زرد بودند. رنگدانه‌های زرد درونی‌ترین حلقه را در مرکز تشکیل می‌دادند. رنگ پرگنه در قسمت پشت پتری قرمز تا قهوه‌ای تیره بود. قطر پرگنه در شرایط دمایی ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت یک ماه روی محیط‌کشت PDA برابر ۵۷ میلی‌متر بود. کنیدیوم‌برها در میسلیوم هوایی عمدتا دارای شاخه‌های کوتاه و شفاف بودند. ماکروکنیدیوم نادر و دارای ۳ تا ۶ دیواره عرضی به شکل خمیده و در دو انتها نوک‌تیز بودند. میکروکنیدیوم به‌فراوانی به‌صورت منفرد گاهی دو سلولی یا سه سلولی با اشکال بیضی در اندازه ۶–۳×۱۰–۷ میکرومتر وجود داشت. کلامیدوسپورها فراوان بودند و به صورت تک، زنجیره‌ای یا خوشه‌ای روی میسلیوم تشکیل شدند (شکل ۱ و ۲).

جدول ۱- فهرست جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش، بافت میزبان و محل جمع‌آوری

Table 1- List of isolates identified in this study, host tissue and collection site

محل جمع‌آوری Locality	بافت میزبان Plant tissues	قارچ Fungus	تعداد جدایه Number of isolate	کد جدایه Code
نصرت‌آباد-علی‌آباد Nosratabad- Aliabad	ریشه Root	*Fusarium chlamydosporum*	6	Z18
کلاله Kalaleh	غلاف برگ Leaf sheath	*F. incarnatum*	4	Z3-GK
پیچک‌محله-علی‌آباد Pichak Mahalleh- Aliabad	ریشه Root	*F. proliferatum*	2	Z2-RPA
زنگیان-گرگان Zangian-Gorgan	ریشه Root	*F. solani*	2	Z34-RZG
علی‌آباد کنار شهر-گرگان Aliabad-e Kenar Shahr-Gorgan	ریشه Root	*F. fujikuroi*	2	Z5-RAG
کردکوی Kordkuy	غلاف برگ Leaf sheath	*F. verticillioides*	2	Z45-GSK
زنگیان-گرگان Zangian-Gorgan	غلاف برگ Leaf sheath	*Sarocladium bactrocephalum*	2	Z20-GZG
بندرگز Bandar Gaz	برگ Leaf	*Nigrospora sphaerica*	2	Z39-BB
زنگیان-گرگان Zangian-Gorgan	برگ Leaf	*N. oryzae*	4	Z42-BZG
کردکوی Kordkuy	Leaf	*Alternaria alternata*	6	Z86-BSK
سرخنکلاته-گرگان SorkhankalatehGorgan	غلاف برگ Leaf sheath	*Epicoccum nigrum*	5	Z87-GSG
نصرت‌آباد-علی‌آباد Nosratabad- Aliabad	غلاف برگ Leaf sheath	*Cladosporium cladosporioides*	4	Z51-BNA



شکل ۱- گونه *Fusarium chlamydosporum*؛ A &B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از یک ماه؛ C) ریسه، کلامیدوسپور؛ D) میکروکنیدیوم؛ E) ماکروکنیدیوم

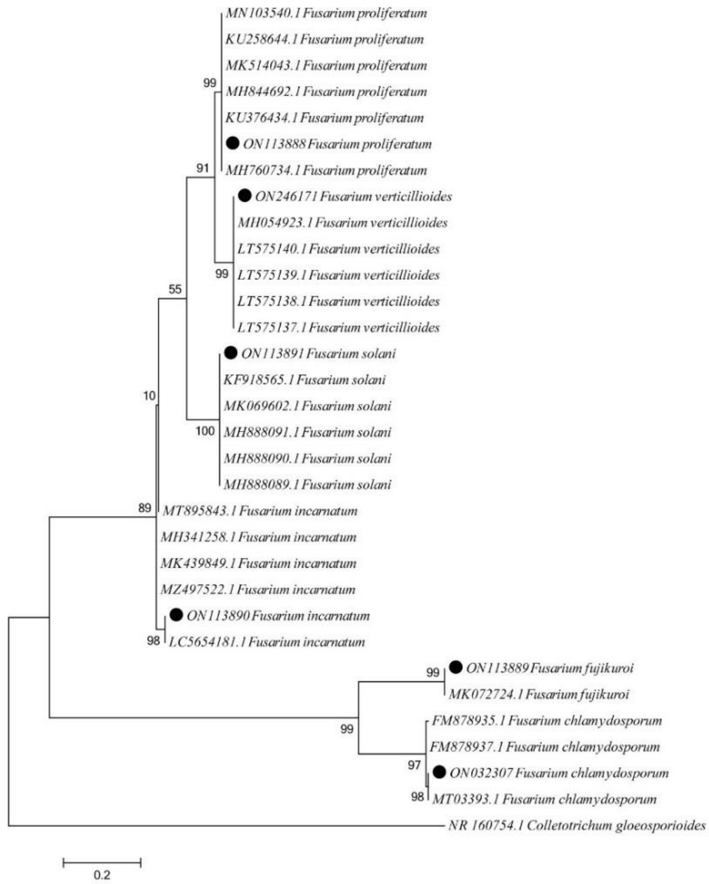
Figure 1- *Fusarium chlamydosporum*: A and B) Colony on PDA after a month; C) Hypha, chlamydospores: D) Microconidia; E) Macroconidia

***Fusarium incarnatum* (Desm.) Sacc., 1886**

از این گونه ۴ جدایه از غلاف برگ برنج جدا شد. پرگنه روی PDA دارای میسلیوم هوایی متراکم، به رنگ سفید مایل به صورتی و در قسمت پشت پتری رنگ پرگنه، صورتی مایل به قهوه‌ای بود. سرعت رشد این گونه ۲/۵۱ تا ۵/۵ میلی‌متر پس از یک هفته بود. میکروکنیدیوم‌ها تک سلولی تا چند سلولی روی کنیدیوم‌برهای هوایی منشعب با اندازه‌های ۵-۳×۱۵-۱۰ میکرومتر بودند. ماکروکنیدیوم چهار تا پنج سلولی، کمی خمیده و مخروطی شکل در راس و ۵-۳×۳۰-۲۰ میکرومتر بودند. زنجیره‌های چندتایی کلامیدوسپور در میسلیوم مشاهده شد (شکل ۳ و ۲).

جدول ۲- کد دسترسی و درصد شباهت جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش
Table 2- Accession number and similarity percentage of the identified isolates

کد دسترسی بانک ژن Gen Bank Accession number		قارچ Fungus	کد جدایه Code
TUB	ITS		
ON872943	ON032307	*Fusarium chlamydosporum*	Z18
ON859911	ON113888	*F. proliferatum*	Z2-RPA
ON872942	ON113890	*F. incarnatum*	Z3-GK
-	ON113886	*Sarocladium bactrocephalum*	Z20-GZG
ON872944	ON113891	*F. solani*	Z34-RZG
ON872941	ON113889	*F. fujikuroi*	Z5-RAG
ON872945	ON246171	*F. verticillioides*	Z45-GSK
-	ON246204	*Nigrospora sphaerica*	Z39-BB
-	ON246205	*N. oryzae*	Z42-BZG
-	−	*Alternaria alternata*	Z86-BSK
-	ON113887	*Epicoccum nigrum*	Z87-GSG
-	−	*Cladosporium cladosporioides*	Z51-BNA

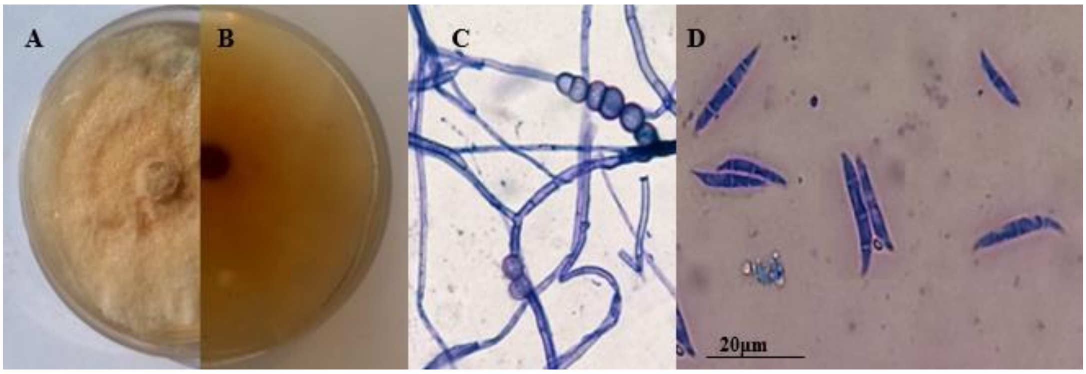


شکل ۲- درخت فیلوژنیک ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه TUB به روش Maximum likelihood در ۳۱ آرایه با استفاده از نرم افزار MEGA 6.06

گونه *Colletotrichum gloeosporioides* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Figure 2- Phylogenetic tree inferred from maximum likelihood analysis of the nucleotide sequence of TUB in 31 taxa generated using MEGA 6.06 software

Colletotrichum gloeosporioides was used as an out group.

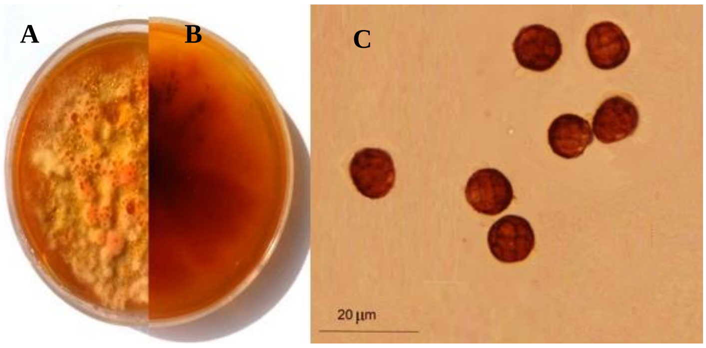


شکل ۳- گونه *Fusarium incarnatum* ؛ A&B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از دو هفته؛ C) ریسه، کلامیدوسپور؛ D) ماکروکنیدیوم

Figure 3- *F. incarnatum*: A and B) Colony on PDA after two weeks; C) Hypha, chlamydospores; D) Macroconidia

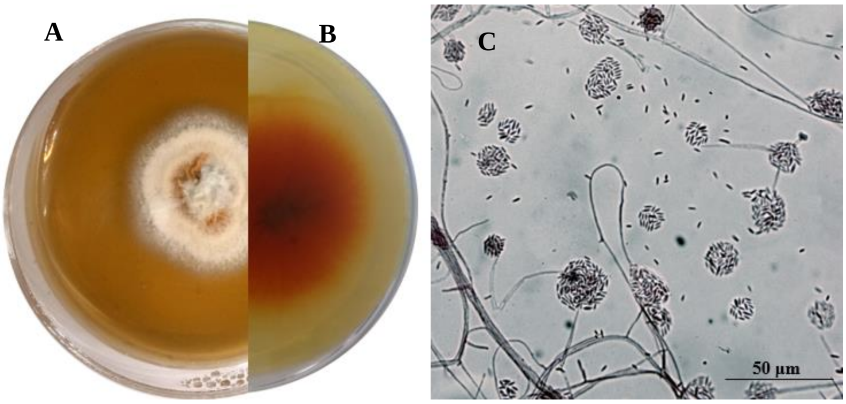
***Epicoccum nigrum* Link, 1816**

از این گونه ۵ جدایه از غلاف برگ برنج جدا شد. پرگنه دارای رشد متراکم میسلیوم با حاشیه نامنظم، به‌رنگ قرمز، ارغوانی، نارنجی تا قرمز تیره بر روی محیط‌کشت PDA بود. سرعت رشد برای این گونه ۲/۱-۸/۰ میلی‌متر در روز ثبت شد. در این گونه کنیدیوبرها نامشخص و کنیدیوم‌ها کروی تا بیضی شکل به‌رنگ قرمز تا قهوه‌ای تیره، توتی‌شکل با دیواره‌های عرضی غیر واضح مشاهده شد. قطر کنیدیوم‌ها ۲۰-۱۰ میکرومتر بود. در پرگنه این گونه روی محیط‌کشت PDA رنگ‌های متفاوتی دیده شد. اسپورزایی در این گونه اغلب به کندی اتفاق افتاد (شکل ۴ و ۶).



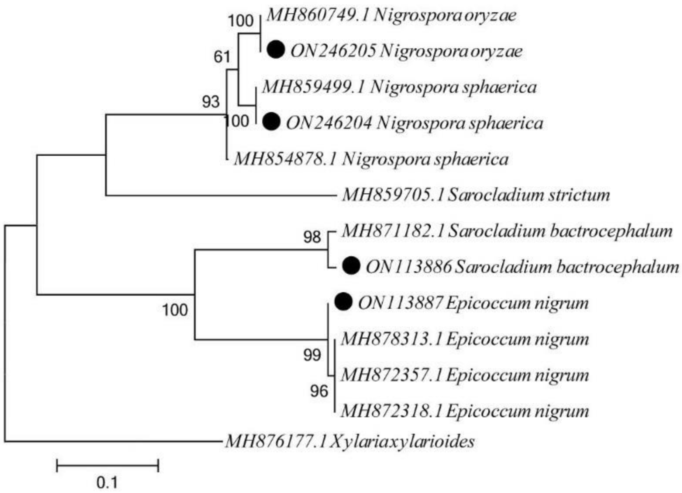
شکل ٤- گونه *Epicoccum nigrum* ؛ A &B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از دو هفته؛ C) کنیدیوم

Figure 4- *Epicoccum nigrum:* A and B) Colony on PDA after two weeks; C) Conidia



شکل ۵- گونه *Sarocladium bactrocephalum*؛ A&B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از یک هفته؛ C) ریسه، کنیدیوم و کنیدیوم‌برها

Figure 5- *Sarocladium bactrocephalum :* A) Colony on PDA after one weeks; B) Hypha, Conidia and Conidiophores



شکل ٦- درخت فیلوژنیک ترسیم شده بر اساس ناحیه ITS به روش Maximum likelihood در ۱۳ آرایه با استفاده از نرم افزار MEGA 6.06
گونه *Xylaria xylarioides* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

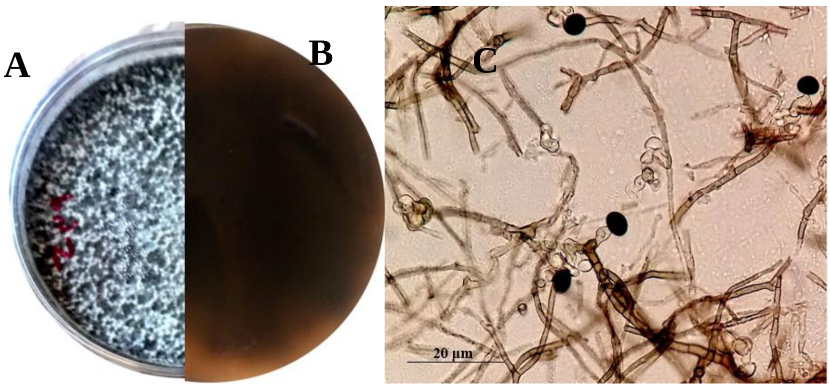
Figure 6- Phylogenetic tree inferred from maximum likelihood analysis of the nucleotide sequence of ITS in 13 taxa generated using MEGA 6.06 software
Xylaria xylarioides was used as out group.

Sarocladium bactrocephalum **(W. Gams) Summerbell 2011**

از این گونه ۲ جدایه از غلاف برگ برنج جدا شد. پرگنه روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۷ روز به ۱۵ تا ۱۸ میلی‌متر رسید. پرگنه به‌صورت سفید متمایل به زرد، برآمده، مرطوب تا لزج و به رنگ نارنجی کم‌رنگ مشاهده شد. میسلیوم رویشی، روشن، صاف و دیواره نازک، به عرض ۲-۱ میکرومتر بود. کنیدیوم‌برها ساده یا با تعداد شاخه کم مستقیماً از هیف‌های رویشی ناشی می‌شوند. کنیدیوم تک سلولی، استوانه‌ای با انتهای گرد، ۸-۳ × ۱/۵-۱ میکرومتر بود. کلامیدوسپور مشاهده نشد (شکل ۵ و ۶).

Nigrospora sphaerica **(Sacc.) E.W. Mason 1927**

از این گونه ۲ جدایه پس از چهار روز از برگ برنج جدا شد. خصوصیات ریخت‌شناسی این گونه با مشخصات ارائه شده در پژوهش دامچ مطابقت داشت (Domsch, 1980). پرگنه این قارچ در محیط PDA سریع‌الرشد بود به‌طوری که قطر پرگنه قارچ پس از ده روز به ۱۰۰ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه در ابتدای رشد به رنگ سفید، اما بعد از گذشت یک هفته و شروع اسپوردهی به تدریج به رنگ خاکستری روشن تا خاکستری تیره همراه با نقاط سفید در آمدند. کنیدیوم‌برها کوتاه به ابعاد ۲۰-۱۵ × ۳۵-۲۰ میکرومتر و هرکدام دارای یک کنیدیوم منفرد بودند. سلول انتهایی کنیدیوم‌بر آمپولی‌شکل، متورم، روشن و به قطر ۱۰-۶ میکرومتر و کروی یا پهن و منفرد و تک سلولی مشاهده شد. کنیدیوم سیاه، کروی تا بیضی‌شکل در ابعاد ۲۰-۱۵ میکرومتر بود (شکل ۷ و ۶).



شکل ۷- گونه *Nigrospora sphaerica* ؛ B&A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از یک هفته؛ C) ریسه، کنیدیوم و کنیدیوم‌برها

Figure 7- *Nigrospora sphaerica* : A and B) Colony on PDA after one weeks; C) Hypha, Conidia and Conidiophores

در این پژوهش، در مجموع ۴۱ جدایه قارچی بـه‌دسـت آمـد کـه بیشترین تعداد جدایه متعلق به غلاف گیاه برنج با فراوانی ۱۷ جدایه و کمترین آن ۱۰ جدایه به ریشه گیاه برنج تعلق داشت. از بین ۶ جـنس شناسایی شده در این تحقیق، بیشترین تعداد جدایه متعلق بـه جـنس های *Alternaria* و *Fusarium* به‌ترتیب هر یک با فراوانی ۶ جدایه و ۱۸ جدایـه، و همچنـین بیشـترین تعـداد گونـه حاصـل بـه جـنس *Fusarium* با فراوانی شش گونه تعلق داشت. جدایـه‌هـای انـدوفیت شناسایی شده در این پژوهش بر اساس ویژگی‌های ریخـت‌شناسـی و مولکـولی بـه گونـه‌هـای *Fusarium chlamydosporum*، *F. proliferatum*، *F. incarnatum*، *F. solani*، *F. fujikuroi*، *F. verticillioides*، *F. bactrocephalum*، *Sarocladium oryzae*، *Nigrospora sphaerica*، *N. oryzae*، *Alternaria alternata*، *Epicoccum nigrum*، *Cladosporium cladosporioides* تعلق داشتند. تمام گیاهان آوندی و غیر آوندی، خشکی‌زی و دریازی مـورد مطالعه، توسط مجموعه‌ای از قارچ‌های انـدوفیت کلـونیزه مـی‌شـوند. قارچ‌های اندوفیت ممکن است در تمام طول زندگی خـود و یـا بـرای مدت زمان طولانی (تا زمان مناسب بودن شـرایط محیطـی) بـه‌طـور نهان و بدون علائم درون بافت گیاه میزبان بـاقی بماننـد، امـا امکـان دارد با تغییر شرایط به بصورت بیماری‌زا تبـدیل شـوند (Debbab *et al.*, 2011). اندوفیت‌ها ممکن است بیمارگرهای فرصت طلب و یا نهفته باشند که می‌توانند در بافت‌های گیاهی به حالت خاموش درآمده و در صورت ضعیف شدن میزبان و یا تغییر در شرایط محیطی موجـب ایجـاد بیمـاری در میزبـان شوند (Coombs and Franco, 2003 ; Sieber, 2007). همچنین ممکن است به خاطر اینکه این قارچها در گیاهان غیرمیزبان قادر به ایجاد بیماری نیستند وارد فاز اندوفیتی شوند (Ganley *et al.*, 2004). برخـی اوقـات بیمارگرهای قارچی یک میزبان خاص معمولاً به عنوان اندوفیت نیز از همـــان میزبـــان جدا شده‌اند (Moricca *et al.*, 2012). حضور قارچ‌های بیماریزای ضعیف گیاهی در بافت‌های سالم نشان دهنده‌ی اکولوژی ناهمگن تجمعات اندوفیتی و ارتباط پیوسته‌ی بین بیمارگرهای نهفته و اندوفیت‌های بدون علائم است (Ganley *et al.*, 2004). روابـط گونـاگونی بـین اندوفیت‌های قارچی و گیاهان میزبان آن‌هـا وجـود دارد کـه از اثـرات متقابل، همزیستی تا آنتاگونیست یا کمی پـاتوژنی را شـامل مـی‌شـود (Chen *et al.*, 2010). به‌طور کلی، اندوفیت‌ها در شرایط رشد طبیعی می‌توانند اثرات خنثی یا مضری برای گیـاه میزبـان داشـته باشـند، در حالی‌که در شرایط تنش یا در طول مراحل مختلف چرخه زندگی گیـاه مفید باشند (Hardoim *et al.*, 2015). به‌عنـوان مثـال *Fusarium verticilliodes* هم به‌عنوان بیمارگر و هم به‌عنوان اندوفیت مفید در ذرت گزارش شده است (Bacon *et al.*, 2008). تعادل بـین ایـن دو حالت به ژنوتیپ میزبان و عوامل تنش غیر زیسـتی بسـتگی دارد کـه موجب بروز علائم بیماری در گیاه و تولید مایکوتوکسین‌ها توسط قارچ مـی‌شـود (Bacon *et al.*, 2008). بـا ایـن حـال، قـارچ انـدوفیت *Fusarium verticilliodes* رشد یک قارچ بیماری‌زای دیگر بـه‌نـام *Ustilago maydis* را سرکوب می‌کنـد و از میزبـان خـود در برابـر بیماری محافظت می‌کند (Estrada *et al.*, 2012). قارچ انـدوفیت *Verticillium dahliae* یک بیمارگر است که موجب کاهش عملکرد زیادی در طیف وسیعی از محصولات زراعی مانند توت‌فرنگی، سـیب زمینی و زیتون می‌شود (Jimenez-Gasco *et al.*, 2014). از سـوی دیگر، این قارچ در بسیاری از گیاهان سالم همچون گیاهـان دارویـی، سیب‌زمینی و انگور به‌عنوان اندوفیت گزارش شده است (Koberl *et al.*, 2013). سویه‌های مفید *Verticillium dahliae* بـرای کنتـرل بیولوژیکی *Ophiostoma novo-ulmi* قـارچی کـه موجـب بیمـاری مرگ نارون هلندی می‌شود، اسـتفاده شـد (Solla and Gil, 2012). گزارش شده است برخی از گونه‌های فوزاریوم موجب رشـد شاخسـاره اسفناج هندی می‌شوند (Islam *et al.*, 2014). در مطالعه حاتم زاده و همکاران برخی از قارچ‌هـای انـدوفیت جداشـده ماننـد *Alternaria consortiale* پارامترهای رشد قابل توجهی را در گیاهـان نسـبت بـه شاهد (سه برابر بیشتر) نشـان دادنـد (Hatamzadeh *et al.*, 2022). گونه‌های جنس آلترناریا معمولا قارچ‌های بیمـاری‌زا هسـتند و اغلـب باعث پژمردگی یا پوسیدگی گیاه میزبان می‌شوند. این یافته‌ها ممکـن است تا حدی از این فرض حمایت کند که رابطه انگلی بین میزبـان و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای آن‌ها ممکن است به یک رابطه مفیـد تبدیل شود (Hardoim *et al.*, 2015). بررسی قارچ‌های اندوفیت در پژوهش حاضر حاکی از آن است که تعدادی از این جدایه‌هـا از جملـه (*F. chlamydosporum*، *F. proliferatum*، *F. fujikuroi*) قارچ-های بیماری‌زا می‌باشند و این امـر بـدین معناسـت کـه مـرز زنـدگی اندوفیتی و بیماری‌زایی قابل تفکیک و مشخص نمـی‌باشـد و شـرایط محیطی و وضعیت تغذیه نوع برهمکنش را تعیین مـی‌کنـد. قـارچ *F. chlamydosporum* از عوامل پوسیدگی فوزاریـومی ریشـه و طوقـه می‌باشد که در بعضی از منـابع بـه عنـوان قـارچ انـدوفیت از گیاهـان مختلف از جمله گیاه *Dendrobium cerumenatum* و لوبیـا چشـم بلبلی گزارش شده است (Jonbozorgi *et al.*, 2019). گونه‌های *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* نیز به‌عنوان عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج و بیماری باکانه گزارش شده‌اند، امـا در ایـن پـژوهش بـه عنوان قارچ اندوفیت از ریشه گیاه برنج جدا شدند. در پژوهشی والینو و همکاران، *F. proliferatum* را به‌عنوان گونه‌ای از قـارچ انـدوفیت از گیـاه بـرنج گـزارش نمودنـد (Valino *et al.*, 2009). جداسـازی و شناسایی این گونه‌ها به‌عنوان اندوفیت احتمالا مرحله نهفتـه آلـودگی است. گونه‌های *Fusarium* از بیشترین و مهـم‌تـرین انـدوفیت‌هـای شناسایی شده هستند (Valino *et al.*, 2009). در میان اندوفیت‌های

جداسازی شده در این پژوهش، گونه‌های *N. sphaerica*، *E. nigrum* و *S. bactrocephalum* برای اولین‌بار به‌عنوان اندوفیت گیاه برنج در ایران گزارش می‌شوند.

منابع

1. Arnold, E.A. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers, *Fungal Biology Reviews*, *21*(2-3), 51–66. https://doi.org/10. 1016/j.fbr.2007.05.003
2. Arnold, A.E., & Herre, E.A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, *95*, 388-398. https://doi.org/10.1080/15572536.2004.1183 3083
3. Bacon, C.W., Glenn, A.E., & Yates, IE. (2008) .*Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Rev*, *27*, 411–446. https://doi.org/10.1080/15569540802497889
4. Barnett, H.L., & Hunter, B.B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Vol. Ed. 4. American Phytopathological Society (APS Press).
5. Cao, L.X., You, J.L., & Zhou, S.N. (2002). Endophytic fungi from *Musa acuminate* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*(2), 169–171. https://doi.org/10.1023/A:1014491528811
6. Chen, X.M., Dong, H.L., Hu, K.H., Sun, Z.R., Chen, J., & Guo, S.X. 2010. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Journal of Plant Growth Regulator*, *29*, 328–337. https://doi.org/10.1007/s00344-010-9139-y.
7. Coombs, J.T., & Franco, C.M.M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Apply Environment Microbiology*, *69*, 5603–5608. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.9.5603-5608.
8. Debbab, A., Aly, A.H., & Proksch, P. (2011). Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity*, *49*(1), 1-12. https://doi.org/10.1007/s13225-011-0114-0
9. Domsch, K.H., Gams, W., & Anderson, T.H. (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press (London) Ltd. 860 PP. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.010521.x
10. Ellis, M.B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, England, 608 pp.
11. Estrada, A.E.R., Jonkers, W., Kistler, H.C., & May, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides, Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetic Biology, 49*, 578–587. http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.05.001.
12. Faeth, S.H., & Fagan, W.F. (2002). Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists, *Integrative and Comparative Biology*, *42*(2), 360–368. https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360
13. Fisher, P.J., & Petrini, O. (1992). Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.), *New Phytologist*, *120*(1), 137–143. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01066.x
14. Ganley, R.J., Brunsfeld, S.J., & Newcombe, G. (2004). *A community of unknown endophytic fungi in western white pine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101, 10107–10112. https://doi.org/10.1073/pnas.0401513101.
15. Ganjali, R., Sharif Nabi, B., & Mirlouhi, A.F. (2004). Classical methods and specific primers in detection of endophytic fungi in some gramineous plants. *Rostaniha*, *5*(1), 37-51. (In Persian)
16. Hamilton, C.E., James, D.B., Labbe, J., & Yang,X. (2016). Mitigating climate change through managing constructed microbial communities in agriculture. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, *216*, 304–308. https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.10.006
17. Hatamzadeh, S., & Rahnama, K. (2016). Isolation and identification of some endophytic fungi of forest trees. *Extension of Plant Protection*, *10*(13,14), 16-22. (In Persian with English abstract). www. ppext.ir.
18. Hatamzadeh, S., Rahnama, K., White, J.F., Akbari Oghaz, N., Nasrollahnejad, S., & Hemati, KH. (2022). Investigation of some endophytic fungi from five medicinal plants with growth promoting ability on maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 0, 1–15.
19. Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Berg, G., & et al. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*, 293–320. https://doi: 10.1128/MMBR.00050-14.
20. Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., & et al. (2014). Growth promotion effect of *Fusarium* spp. PPF1 from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) rhizosphere on Indian spinach (*Basella alba*) seedlings are linked to root colonisation. *Archiv Phytopathology Plant Protection*, *47*, 2319–31. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.876745
21. Jiménez-Gasco, M.M., Malcolm, G.M., Berbegal, M., Armengol, J., & Jiménez Díaz, R.M. (2014). Complex molecular relationship between vegetativecompatibility groups (VCGs) in *Verticillium dahliae*: VCGs do not always align with clonal lineages. *Phytopathology*, *104*, 650–659. http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0180-

R.
22. Jonbozorgi, S., Mehrabi-Koushki, M., & Farokhinejad, R. (2019). Isolation and Identification of Fungal Endophytes of the Cowpea in Khuzestan Province. *Biological Journal of Microorganism*, *8*(29), 97-115. (In Persian)
23. Köberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E.M, Bauer, R., & Berg, G. (2013). The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Front Microbiology*, *l4*, 400. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00400.
24. Larran, S., Perello, A., Simon, M.R., & Moreno, V. (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticium aestivum* L). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(4), 565–572. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9266-6
25. Leslie, J.F., & Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. First Edition. 388pp. https://doi.org/10.1002/9780470278376
26. Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M., & Schenk, P.M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology 8*, 2552. https://doi.org/10.3389/ fmicb.2017.02552
27. Liu, H., Brettell, L.E., Qiu, Z., & Singh, B.K. (2020a). Microbiome-mediated stress resistance in plants. *Trends in Plant Science*, *25*, 733–743. https://doi.org/10.1016/j .tplants.2020.03.014
28. Moricca, S., Ginetti, B., & Ragazzi, A. (2012). Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*, 587–598. https://doi.org/10.14601/PhytopatholMediterr-11705
29. Nair, D.N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, Article ID 250693, 11 pages. https://doi.org/10.1155/2014/250693
30. Nemati, H., & Abdollahzadeh, A. (2009). *Sweet and sourcherry- Production and Utilization*. Jehad University of Mashhad Press, Iran. (In Persian)
31. Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Emergent properties: endophytes and microbiomes, *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 291–315. https://doi.org/10. 1146/annurev-phyto-080508-081831
32. O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *7*, 103-107. https://doi.org/10.1006/ mpev.1996.0376.
33. Rao, A.N., Johnson, D.E., Sivaprasad, B., Ladha, J.K., & Mortimer, A.M. (2007). Weed management in direct-seeded rice. *Advances in Agronomy*, *93*, 153–255. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)93004-1
34. Rodriguez, R.J., Redman, R.S., & Henson, J.M. (2005). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, *9*, 261–272. https://doi.org/10.1023/b:miti.0000029922. 31110.97
35. Rodriguez, R., White, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, *182*(2), 314-330. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
36. Solla, A., & Gil, L. (2012). Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmiin* Ulmus minor. *Plant Pathology*, *52*, 579–585. http://dx.doi.org/10. 1046/j.1365-3059.2003. 00921.x
37. Santamaria, J., & Bayman, P. (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffee arabica*). *Microbial Ecology*, *50*(1), 1–8. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1
38. Schulz, B., & Boyle, C. (2005). Review: The endophytic continuum. *Mycological Research*, *109*, 661-686. https://doi.org/10.1017/S095375620500273X
39. Sheteiwy, M.S., Ali, D.F., Xiong, Y.C., Brestic, M., Skalicky, M., Hamoud, Y.A., Ulhassan, Z., Shaghaleh, H., AbdElgawad, H., Farooq, M., & Sharma, A. (2021b). Physiological and biochemical responses of soybean plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* under drought stress. *BMC Plant Biology*, *21*, 195. https://doi.org/10.1186/s12870-021-02949-z
40. Sieber, T.N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, *21*(2), 75-89. https:// doi:10.1016/j.fbr.2007.05.004
41. Staniek, A., Woerdenbag, H.J., & Kayser, O. (2008). Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal Plant Interaction*, *3*, 75–93. https://doi.org/10.1080/17429140801886293
42. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolutionment*, *30*, 2725-2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
43. Tan, R.X., & Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, *18*, 448-459. https://doi.org/10.1039/b100918o
44. Tintjer, T., & Rudgers, J.A. (2006). Grass-Herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. *New Phytologist*, *170*, 513-521. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01720.x
45. Weber, D. (2009). *Endophytic fungi, occurrence and metabolites*. In: Anke, T. & Weber, D. (eds). The Mycota.

Vol. XV, Physiology and Genetics selected basis and applied aspects springer Ver lag, Berlin, Germany, pp. 153–195. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00286-18

46. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Inis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J.(eds). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA, pp. 315–322. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
47. Vallino, M., Greppi, D., Novero, M., Bonfant, P., & Luppoto, E. (2009). Rice root colonization by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. *Annals of Applied Biology*, *154*, 195-204. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00286.x